

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 19, 1981, pp. 55–60

## Selektive Charakterisierung von N1-Methyladenosin neben N7-Methylguanosin im Harn

Von E. Schlimme, K. S. Boos

Laboratorium für Biologische Chemie der Universität (GH) Paderborn und

M. Weise

Zentrum für Innere Medizin am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

(Eingegangen am 30. Mai/29. September 1980)

**Zusammenfassung:** Die selektive Bestimmung der harngängigen, im Heterocyclus N-methylierten Ribonucleoside N1-Methyladenosin ( $m^1\text{Ado}$ ) und N7-Methylguanosin ( $m^7\text{Guo}$ ) neben anderen Nucleosiden wird beschrieben. Der Nachweis von  $m^1\text{Ado}$  und  $m^7\text{Guo}$  beruht auf chromatographischen Techniken unter Einbeziehung substanzspezifischer chemischer Reaktionen.

Die in Kinderurinen gemessenen  $m^1\text{Ado}$ -Werte zeigen neben einem offenbar altersabhängigen Gang eine deutliche Beziehung zur Höhe der Harnstoffausscheidung.

### *Selective characterisation of N1-methyladenosine and N7-methylguanosine in urine*

**Summary:** We describe the selective analysis of N-methylated ribonucleosides, i.e., N1-methyl adenosine ( $m^1\text{Ado}$ ) and N7-methyl guanosine ( $m^7\text{Guo}$ ) in the presence of other nucleosides in urine.  $m^1\text{Ado}$  as well as  $m^7\text{Guo}$  were characterized by use of chromatographic techniques including substance specific chemical reactions.

$m^1\text{Ado}$  values in children urines seem to be age-dependent and related to urea elimination.

## Einführung

Die analytische Erfassung der Grundbausteine von Nucleinsäuren in Körperflüssigkeiten eröffnet weitere diagnostische Möglichkeiten im Bereich der klinischen Chemie (1–6). Das Hauptinteresse der vorliegenden Arbeit gilt der selektiven Bestimmung der im Purinkern N-methylierten Ribonucleoside N1-Methyladenosin ( $m^1\text{Ado}$ ) und N7-Methylguanosin ( $m^7\text{Guo}$ ) neben anderen Nucleosiden. N1-Methyladenosin wurde im TΨ-loop (Position 58) vieler Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNA) nachgewiesen (7). N7-Methylguanosin ist Bestandteil der 5'-terminalen Kappe eukaryotischer Messenger-Ribonucleinsäure (mRNA) (8, 9). Beide methylierten Nucleoside geben als Ausscheidungsprodukte im Urin somit Aufschluß über den Katabolismus ("turnover") von tRNA und mRNA und lassen damit Rückschlüsse auf den metabolischen Status, wie z. B. der Transkriptions- und Proteinbiosyntheserate, des Organismus zu.

## Material und Methoden

### *Nucleoside*

Adenosin (Ado), 2'-Desoxyadenosin (2' dAdo) und Guanosin (Guo) wurden von Boehringer, Mannheim, N1-Methyladenosin ( $m^1\text{Ado}$ ), N6-Methyladenosin ( $m^6\text{Ado}$ ), N7-Methylguanosin ( $m^7\text{Guo}$ ), Pseudouridin (Ψ) und 2'-O-Methyladenosin ( $\text{Ado}^2\text{m}$ ) von Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA, bezogen.

### *Boronsäure-Biogel*

1 g Biogel Hydrazid (Bio-Gel P 2-Hydrazide, 200–400 mesh, Biorad Laboratories, Richmond, Cal., USA) wurde gemäß einer Literaturvorschrift (1) mit Bernsteinsäureanhydrid (Sigma, s.o.) umgesetzt; das succinylierte Gel wurde anschließend in Anwesenheit äquimolarer Mengen an 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDAC) (Biorad, s.o.) mit *m*-Aminophenylboronsäure (Sigma, s.o.) gekuppelt.

Unter alkalischen Bedingungen, d.h. nach Äquilibrierung des Boronsäure-Biogels in 0,25 mol/l Ammoniumacetatpuffer, pH 8,8, ist das Affinitätsgel in der Lage, Nucleoside mit *cis*-Diolgruppen selektiv zu binden (1, 2, 10, 11) während z. B. 2'-Desoxyribonucleoside nicht retiniert werden.

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die analytische Trennung der Nucleoside erfolgte mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemäß l. c. (12) über eine Glassäule (300 × 5 mm); stationäre Phase, Nucleosil 10 SA (Macherey und Nagel, Düren); mobile Phase, 0,4 mol/l Ammoniumformiat pH 4,1; weitere Angaben siehe Legende der Abbildungen 3 und 4.

### Vorbereitung des Harns

3 ml Urin wurden tiefgefroren (−20 °C), aufgetaut, bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abschließend durch ein Membranfilter (Millox 0,22 µm, Millipore, Buc, Frankreich) filtriert.

### Abtrennung der Ribonucleoside des Harns

3 ml des keimfreien und partiell enteiweißten Harns wurden auf die mit Phenylboronsäure funktionalisierte Biogelsäule (5 × 0,5 cm) aufgegeben. Nach Äquilibration mit 0,25 mol/l Ammoniumacetatpuffer, pH 8,8, und Aufgabe des Harns wurde die Biogelsäule zunächst mit bidest. Wasser gewaschen. Hierdurch werden die ungeladenen Ribonucleoside wie z. B. Adenosin, Guanosin und Pseudouridin eluiert. Anschließend wurden mit 0,1 mol/l Essigsäure die kationischen im Purinkern N-methylierten Nucleoside wie m<sup>1</sup>Ado und m<sup>7</sup>Guo von der Biogelsäure abgelöst (Abb. 2).

### HPLC-Trennung der N-methylierten Ribonucleoside

Das Eluat der im Kern N-methylierten Ribonucleoside (etwa 5–10 ml) wurde lyophilisiert und in 250 µl bidest. Wasser gelöst. 5–10 µl dieser Lösung wurden liquidchromatographisch analysiert (siehe Abb. 3, 4).

Ein Aliquot des Biogelsäule-Eluates wurde mit NaOH auf pH 10 eingestellt, nach 4–5 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur neutralisiert und davon wiederum 10 µl liquidchromatographisch untersucht (siehe Abb. 3, 4). Die liquidchromatographische Differenzierungstechnik beruht auf dem chemischen Verhalten der N-methylierten Ribonucleoside m<sup>1</sup>Ado und m<sup>7</sup>Guo. Unter alkalischen Bedingungen unterliegt m<sup>1</sup>Ado einer *Dimroth*-Umlagerung unter irreversibler Bildung des stabilen N6-Methyladenosins, m<sup>6</sup>Ado (Abb. 1).

Beim m<sup>7</sup>Guo tritt im alkalischen Milieu (pH 9–10) eine Spaltung des Imidazolringes unter Bildung eines Pyrimidinnucleosides auf (Abb. 1) (13, 14), die ebenfalls beim Neutralisieren nicht reversibel ist.

Der Harnstoffgehalt wurde im enzymatischen Farbstest (Test-Combination Boehringer, Mannheim) unter Einbeziehung einer internen Qualitätssicherung mit Precinorm<sup>RU</sup> (Boehringer, Mannheim) bestimmt.

### Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 2a zeigt das Elutionsdiagramm eines synthetischen Nucleosidgemisches in 0,25 mol/l Ammoniumacetatpuffer, pH 8,8, von einer Boronsäure-Biogelsäule.

In Abbildung 2b ist das Elutionsdiagramm abgebildet, das bei der Chromatographie einer mit Ammoniumacetat (0,25 mol/l) auf pH 8,8 gepufferten und mit synthetischen Nucleosiden aufgestockten Urinprobe erhalten wurde.

Die „Recovery“ lag für die eingesetzten Nucleoside im untersuchten Konzentrationsbereich bei ≥ 90 Prozent.

Abbildung 2c schließlich zeigt als Beispiel ein Elutionsdiagramm einer reinen Harnprobe (3 ml vorbereiteter Morgenurins s.o.; H. S. ♂ 11 Jahre). Bei allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Harnproben (Tabelle 1)

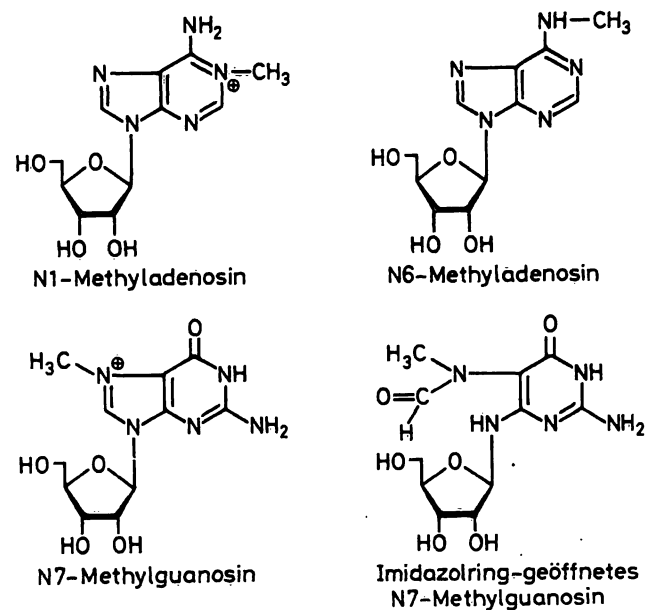


Abb. 1. Struktur von N1-Methyladenosin (m<sup>1</sup>Ado), N6-Methyladenosin (m<sup>6</sup>Ado), N7-Methylguanosin (m<sup>7</sup>Guo) und 2-Amino-4-ribofuranosylamido-5-formamidomethyl-6-oxypyrimidin (Imidazolring-geöffnetem N7-Methylguanosin).

wurde – um die beschriebenen Umlagerungen von im Purinkern N-methylierten Ribonucleosiden weitgehend zu unterdrücken – eine Pufferung auf pH 8,8 vermieden und der ursprüngliche pH-Wert der Harnprobe unverändert belassen. Dieses war bei der Zielsetzung der Arbeit möglich, da eine selektive Bestimmung von m<sup>1</sup>Ado neben m<sup>7</sup>Guo angestrebt wurde und deshalb auf eine Analyse aller wassereludierbaren Nucleoside verzichtet werden konnte.

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die HPLC-Chromatogramme der Nucleoside sowie als Beispiel eines über die Boronsäure-Biogelsäule gewonnenen nucleosidhaltigen Harneluates (H. S. ♂ 11 Jahre; entspricht Elutionspeak III in Abb. 2c). Die Zuordnung der Retentionszeiten von m<sup>1</sup>Ado und m<sup>6</sup>Ado bzw. m<sup>7</sup>Guo und dem Imidazolring-geöffneten m<sup>7</sup>Guo gelang mit authentischem Material unter Einbeziehung von UV-Spektren (Shimadzu UV-200 Spektrometer) für die Charakterisierung der Nucleoside m<sup>1</sup>Ado ( $\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 13,9 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ , pH 7), m<sup>6</sup>Ado ( $\lambda_{\max} = 266 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 15,9 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ , pH 7), m<sup>7</sup>Guo ( $\lambda_{\max} = 259 \text{ nm}$  [Schulter bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ],  $\epsilon = 9,7 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ , pH 7) und Imidazolring-geöffnetes m<sup>7</sup>Guo ( $\lambda_{\max} = 265 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 10 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ , pH 11).

Durch zusätzliche <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchungen mit m<sup>1</sup>Ado und m<sup>7</sup>Guo konnte sichergestellt werden, daß während der Vortrennung über die Boronsäure-Biogelsäure – wobei der Harn ohne Ammoniumacetatpufferzugabe (pH 8,8) auf die Säule aufgegeben und sofort mit Wasser eluiert wurde – nur etwa 5 Prozent des eingesetzten m<sup>1</sup>Ado in m<sup>6</sup>Ado umgelagert und ≤ 10 Prozent m<sup>7</sup>Guo in Imidazolring-geöffnetes m<sup>7</sup>Guo

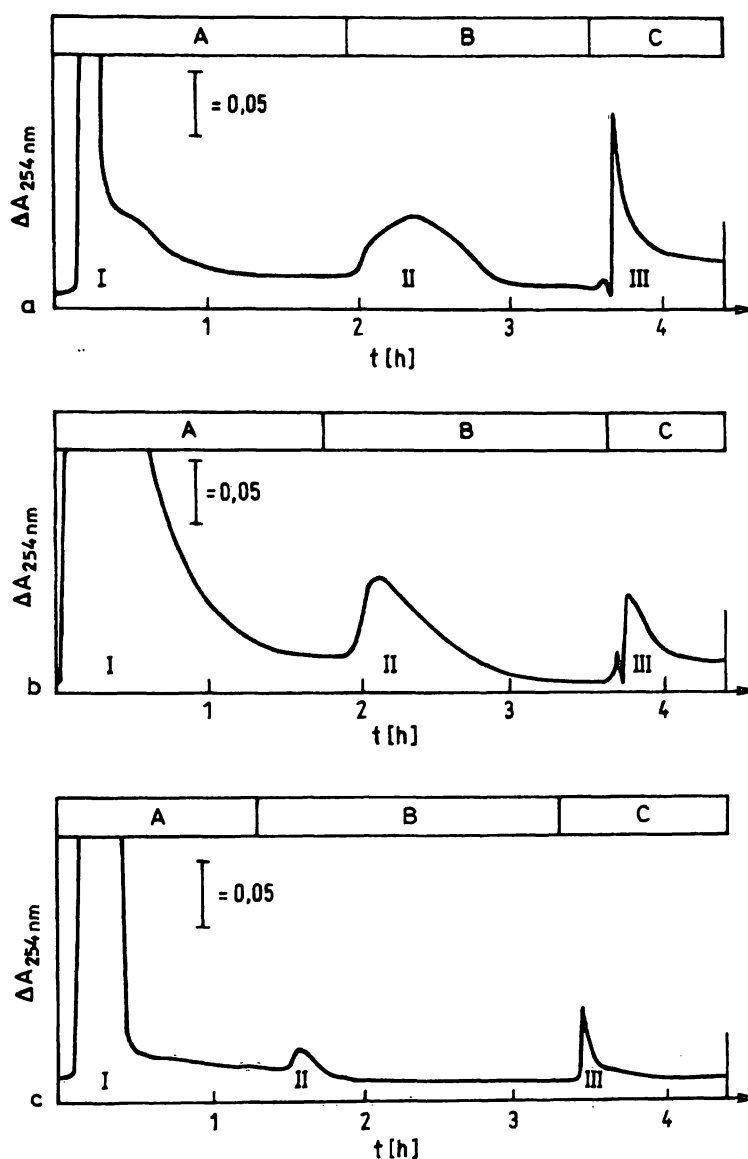


Abb. 2. Elutionsdiagramm von Boronsäure-Biogelsäule.

- In 1 ml 0,25 mol/l Ammoniumacetatpuffer, pH 8,8 wurden 4 mmol – in äquimolaren Konzentrationen – an Ado, 2'dAdo, 2'-O-Methyl Ado, m<sup>1</sup> Ado, Guo, m<sup>7</sup>Guo und  $\psi$  auf eine Boronsäure-Biogelsäule (5 × 0,5 cm) gegeben und nacheinander mit (A) 0,25 mol/l Ammoniumacetatpuffer, pH 8,8, (B) Wasser, (C) 0,1 mol/l Essigsäure eluiert. Peak I: 2'dAdo, 2'-O-Methyl-Ado; Peak I (Schulter);  $\psi$ ; Peak II: Guo, Ado; Peak III: m<sup>1</sup> Ado, m<sup>7</sup>Guo.
- 3 ml eines vorbereiteten und auf 0,25 mol/l Ammoniumacetat, pH 8,8, eingestellten Urins (B. B. 9 2,5 Jahre) wurden mit Nucleosiden bis auf 2'dAdo und 2'-O-Methyl Ado wie bei Abb. 2a beschrieben aufgestockt und über eine mit 0,25 mol/l Ammoniumacetat, pH 8,8, äquilibrierte Boronsäure-Biogelsäule chromatographiert. Elutionsfolge: (A) 0,25 mol/l Ammoniumacetatpuffer, pH 8,8, (B) Wasser, (C) 0,1 mol/l Essigsäure. Peak I:  $\psi$  neben absorbierenden Harninhaltsstoffen; Peak II: Ado, Guo; Peak III: m<sup>1</sup> Ado, m<sup>7</sup>Guo.
- 3 ml vorbereiteter und auf 0,25 mol/l Ammoniumacetat, pH 8,8, eingestellter Urin (H. S. 6 11 Jahre) wurde über eine mit 0,25 mol/l Ammoniumacetatpuffer, pH 8,8, äquilibrierte Boronsäure-Biogelsäule chromatographiert. Die Elution erfolgte wie in der Legende (Abb. 2b) beschrieben. Peak I:  $\psi$  und Desoxyribonucleoside neben absorbierenden Harninhaltsstoffen; Peak II: Ribonucleoside (nicht näher charakterisiert); Peak III: charakterisiert wurde Hauptkomponente m<sup>1</sup>Ado neben m<sup>7</sup>Guo.

aufgespalten wurden. Bei einer Vortrennung mit 0,25 mol/l Ammoniumacetatpuffer, pH 8,8, über etwa 2 Stunden (Abb. 2c) ist mit einer m<sup>1</sup>Ado → m<sup>6</sup>Ado Umlagerung von etwa 10 Prozent und mit einer m<sup>7</sup>Guo-Spaltung von etwa 15 Prozent zu rechnen.

In den bisher untersuchten Urinen (siehe Tab. 1) konnte m<sup>1</sup>Ado als Hauptkomponente der N-methylierten Nucleoside nachgewiesen werden. Dieser Befund bestä-

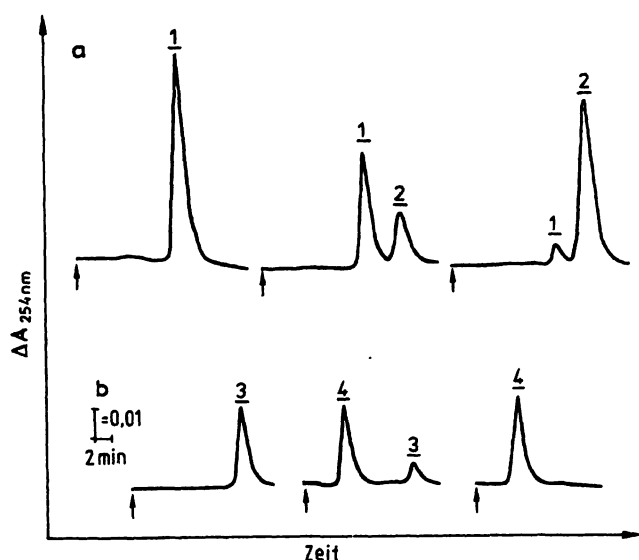
tigt frühere Beobachtungen (1,15), nach denen m<sup>1</sup>Ado ausgeschieden wird und nachgewiesenes m<sup>6</sup>Ado ein während der Analyse durch Umlagerung aus m<sup>1</sup>Ado entstandenes artefizielles Produkt ist. Der Ausscheidungs-spiegel an m<sup>7</sup>Guo ist um eine Größenordnung geringer.

Der Nachweis von m<sup>1</sup>Ado im Bereich von 5–10 mg × l<sup>-1</sup> im Urin des Menschen wirft die Frage auf, ob diese Verbindung als Modell für die renale Elimination von Ri-

Tab. 1. Gehalt des Harns an m<sup>1</sup>Ado und m<sup>7</sup>Guo.

Proband	Alter (Jahre)	Ausscheidung von m <sup>1</sup> Ado		Harnstoff		m <sup>1</sup> Ado/Harnstoff-Quotient		Ausscheidung von m <sup>7</sup> Guo	
		[mg × l <sup>-1</sup> ]	[μmol × l <sup>-1</sup> ]	[g × l <sup>-1</sup> ]	[mol × l <sup>-1</sup> ]	[mg/g]	[μmol/mol]	[mg × l <sup>-1</sup> ]	[μmol × l <sup>-1</sup> ]
V. S. <sup>a)</sup>	♀	4 ± 0,3 <sup>d)</sup>	14 ± 1	11 ± 2	0,18 ± 0,04	0,36	78	≤ 0,1	≤ 0,5
B. B. <sup>a)</sup>	♀	5 ± 0,3	18 ± 1	11 ± 2	0,18 ± 0,04	0,45	100		
J. S. <sup>a)</sup>	♂	6 ± 2	23 ± 8	23 ± 4	0,38 ± 0,07	0,26	61	0,4 ± 0,1	1,3 ± 0,5
H. S. <sup>a)</sup>	♂	8 ± 3	27 ± 9	27 ± 4	0,45 ± 0,07	0,30	60	0,5 ± 0,1	1,6 ± 0,5
K. S. <sup>b)</sup>	♀	1 ± 0,3	4 ± 1	4 ± 1	0,07 ± 0,02	0,25	57	0	0
E. H. <sup>c)</sup>	♂	7 ± 0,2	27 ± 1	42 ± 2	0,69 ± 0,03	0,17	39	2,9 <sup>e)</sup> ± 0,3	10 ± 1
24 h Ausscheidung									
		m <sup>1</sup> Ado		Harnstoff		m <sup>1</sup> Ado		Harnstoff	
		[mg]		[μmol]		[mg]		[mmol]	
J. S. <sup>c)</sup>	♂	8,5	22 ± 3	26 ± 2	0,45 ± 0,04	0,23	49	2,9 ± 0,5	12,5 ± 1,0
H. S. <sup>c)</sup>	♂	11	30 ± 1	29 ± 3	0,48 ± 0,05	0,29	63	2,9 ± 0,1	10,0 ± 1,0

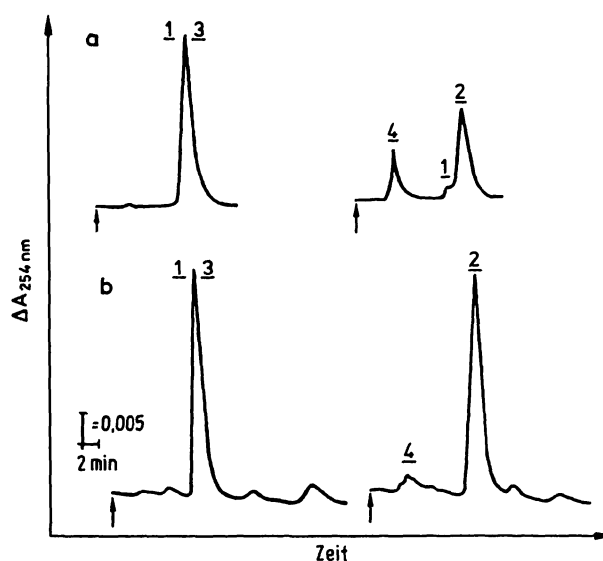
<sup>a)</sup> Morgenurin <sup>b)</sup> Tagesurin (nach Flüssigkeitsaufnahme) <sup>c)</sup> 24-Stundenurin <sup>d)</sup> Standardabweichung <sup>e)</sup> HPLC-Chromatographie (Kontron Gradientensystem 410) auf Partisil SCX; mobile Phase: 0,08 mol/l Ammoniumformiat pH 4,1; Fließgeschwindigkeit: 2 ml × min<sup>-1</sup>; Retentionszeiten [min]: m<sup>1</sup>Ado = 3,10, m<sup>6</sup>Ado = 1,95, m<sup>7</sup>Guo = 2,65, Imidazolring-geöffnetes m<sup>7</sup>Guo = 1,0 (16).

Abb. 3. HPLC-Analyse von  $m^1$ Ado und  $m^7$ Guo

a) HPLC-Diagramme vor, während und nach der Umlagerung (in dieser Reihenfolge) von  $m^1$ Ado (1) in  $m^6$ Ado (2). Retentionszeiten  $R_t$  [min]:  $m^1$ Ado (1) = 14,0;  $m^6$ Ado (2) = 18,8.

b) HPLC-Diagramme vor, während und nach der Umlagerung (in dieser Reihenfolge) von  $m^7$ Guo (3) in das ringoffene Pyrimidinderivat (4). Retentionszeiten  $R_t$  [min]:  $m^7$ Guo (3) = 14,8; (4) = 5,6.

Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase:  $18 \text{ ml} \times \text{h}^{-1}$  bei einem Druck von 800 pounds/inch<sup>2</sup>.

Abb. 4. HPLC-Analyse von  $m^1$ Ado neben  $m^7$ Guo

a) HPLC-Diagramme eines Gemisches von  $m^1$ Ado (1) und  $m^7$ Guo (3) vor und nach der Umlagerung in  $m^6$ Ado (2) und ringoffenes Pyrimidinderivat (4). Retentionszeiten  $R_t$  [min]:  $m^1$ Ado (1),  $m^7$ Guo (3) = 12,8; (4) = 5,4,  $m^6$ Ado (2) = 14,8.

b) HPLC-Diagramme eines Boronsäure-Biogel-Eluates (Aliquot von Peak III, Abb. 2c – entspricht etwa 120  $\mu\text{l}$  Ausgangsharn –, H. S.  $\sigma$  11 Jahre) vor und nach der Umlagerung unter alkalischen Bedingungen. Retentionszeiten  $R_t$  [min]:  $m^1$ Ado (1),  $m^7$ Guo (3) = 12,8; (4) = 5,4,  $m^6$ Ado (2) = 14,8.

Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase:  $18,5 \text{ ml} \times \text{h}^{-1}$  bei einem Druck von 900 pounds/inch<sup>2</sup>.

bonucleosiden dienen kann. Unbekannt ist bisher – und das läßt sich auch noch nicht durch die vorliegenden Ergebnisse beantworten –, ob Ribonucleoside wie z. B.  $m^1$ Ado aus dem Serum stammen oder von den ableitenden Harnwegen sezerniert werden.

Die experimentellen Befunde zeigen, daß die Methode zum Nachweis von  $m^1$ Ado in etwa 1 ml Urin geeignet ist. Die gemessenen Werte zeigen neben einem offenbar altersabhängigen Gang in der  $m^1$ Ado-Konzentration eine deutliche Beziehung zur Höhe der Harnstoffausscheidung. Der Quotient aus  $m^1$ Ado und Harnstoff bei den unter-

suchten Kinderurinen liegt bei  $67 (s = \pm 17) \mu\text{mol/mol}$ . Die Einbeziehung von Urin mit pathobiochemischen Ausscheidungsmustern wird zeigen, ob der  $m^1$ Ado/Harnstoff-Quotient eine klinisch-diagnostisch verwertbare Aussage erlaubt.

#### Danksagung

Wir danken Frau Renate Schroer für geschickte technische Mitarbeit. Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell gefördert.

#### Literatur

1. Uziel, M., Smith, L. H. & Taylor, S. A. (1976), Clin. Chem. 22, 1451–1455.
2. Davis, G. E., Suits, R. D., Kuó, K. C., Gehrke, C. W., Waalkes, T. P. & Borek, E. (1977), Clin. Chem. 23, 1427–1435.
3. Solle, M. (1977), J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 371–374.
- 4a. Schöch, G., Winkler, K., Heller-Schöch, G. & Baisch, H. (1979), Klin. Pädiatr. 191, 197–204.
- b. Schöch, G., Heller-Schöch, G., Lorenz, H., Baisch, H., Weser, M., Leifer, W. & Grüttner, R. (1977), Mschr. Kinderheilk. 125, 542–543.
- 5a. Chheda, G. B., Hong, C. I., Dulta, S. P., De, N. C. & Parthasavathy, R. (1974), in Proc. of the Symp. of the Recent Developments in Oligonucleotide Synthesis and the Chemistry of Minor Bases of tRNA, Polish Academy of Sciences, Poznan, Polen, p. 3–33.
- b. De, N. C. & Chheda, G. B. (1979), J. Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides 6, 371–385.
6. Park, R. W., Holland, J. F. & Jenkins, A. (1962), Cancer Res. 22, 469–477.

7. Sprinzl, M., Grüter, F., Spelzhaus, A. & Gauss, D. H. (1980), *Nucleic Acid Research (Special Supplement)* 8, r1-r22.
8. Shatkin, A. J. (1976), *Cell* 6, 645-653.
9. Filipowicz, W. (1978), *FEBS-Lett.* 96, 1-11.
10. Conner, J. M. & Bulgrin, V. C. (1967), *J. Inorg. Nucl. Chem.* 29, 1953-1961.
11. Schott, H. (1972), *Angew. Chem.* 84, 819-820.
- 12a. Stahl, K. W., Schlimme, E. & Schäfer, G. (1973), *J. Chromatogr.* 76, 477-481.
- b. Stahl, K. W., Schlimme, E. & Bojanovski, D. (1974), *J. Chromatogr.* 83, 395-404.
- 13a. Brookes, P. & Lawley, P. D. (1960), *J. Chem. Soc.* 539-545.
- b. Brookes, P. & Lawley, P. D. (1961), *J. Chem. Soc.* 3923-3928.
14. Haines, J. A., Reese, C. B. & Lord Todd, A. (1962), *J. Chem. Soc.* 5281-5288.
15. Fink, K. & Adams, W. S. (1968), *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 27-33.
16. Schlimme, E., Hagemeyer, E., Boos, K. S. & Weise, M. (1980), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 696-697 (Abstract).

Prof. Dr. Dr. Eckhard Schlimme  
Laboratorium für Biologische Chemie  
der Universität (GH)  
Warburger Straße 100  
D-4790 Paderborn